

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A61K 31/70

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/23506

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum: 8. August 1996 (08.08.96)

DE

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00169

(22) Internationales Anmeldedatum: 31. Januar 1996 (31.01.96)

(30) Prioritätsdaten:

195 03 152.0 195 45 892.3 1. Februar 1995 (01.02.95)

8. December 1995 (08.12.95) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG
DER ANGEWAN DTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE];
Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FAHRIG, Rudolf [DE/DE]; Fritz-Goy-Weg 3, D-30657 Hannover (DE). STEINKAMP-ZUCHT, Angela [DE/DE]; Roonstrasse 3, D-30161 Hannover (DE).

(74) Anwalt: BUTENSCHÖN, BERGMANN, NÖTH, REIT-ZLE, GRAMBOW, KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: BR, JP, KR, MX, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der filr Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: USE OF 5'SUBSTITUTED NUCLEOSIDES TO PROVIDE RESISTANCE IN CYTOSTATIC TREATMENT AND MEDICA-MENTS CONTAINING SAID NUCLEOSIDES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBILDUNG BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESE NUKLEOSIDE

(57) Abstract

The invention relates to the use of 5'substituted nucleosides in combination with at least one cytostatic in the production of a medicament to prevent or reduce the build-up of resistance in cytostatic treatment and a medicament containing BVDU and/or its metabolites.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in Kombination mit mindestens einem Zytostatikum zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung bzw. Reduktion der Resistenzbildung bei der Zytostatikabehandlung sowie ein Arzneimittel, enthaltend BVDU und/oder seine Metaboliten.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

:.				
- ^: .	.AM	Armenien GB	Vereinigtes Königreich	MX Mexiko
٠.	AT	Outcreich GE		NE Niger
	AU .	Australien GN		NL Niederlande
	BB	Barbados GR		NO Norwegen
:	BE	Belgien HU		NZ Neusceland
٠.	BP	Burkina Faso 12	·	PL Polen
	. BG	Bulgarien		PT Portugal
	BJ .	Benin Jp	_	RO Ruminien
٠	BR	Brasilien KE		RU Russische Föderation
	BY	Belarus KG		SD Sudan
	CA	Kamada KP		SE Schweden
٠.	CT .	Zentrale Afrikanische Republik KR		SG Singapur
	CG	Kongo KZ	1.10.00	SI Slowenien
	CH .	Schweiz		SK Slowakei
	α	Côte d'Ivoire LK		SN Senegal
	CM	Kamenin LR		SZ Swasiland
•	CN ·	China LK		TD Tschad
٠.	CS	Tachechoslowakei LU		TG Togo
	CZ,	Tachechische Republik LV		TJ Tadschikistun
	ĎΕ	Deutschland MC		TT Trinklad und Tobago
	DK	Dinemark MD	_ · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	UA Ultraine
÷.,.	EB .	Estland MG		UG Uganda
	ES	Spanica ML		US Vereinigte Staaten von Amerika
	Fi	Finnland MN		UZ Usbekistan
	FR	Frankreich MR		VN Victory
·	GA . ,	Gabon . MW	Malawi	* ************************************
	•			

VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBIL-DUNG BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESE NUKLEOSIDE

5

Das Auftreten von "Arzneimittel-Resistenz" ist der
Hauptgrund für Fehlschläge in der Krebs-Chemotherapie. Tumoren, welche anfangs empfindlich auf Zytostatika reagieren, erholen sich sehr häufig nach einer
gewissen Behandlungszeit und sind dann resistent gegenüber der Wirkung verschiedenartiger antineoplastischer Arzneimittel. Obwohl das Problem der "Arzneimittel-Resistenz" schon seit 1948, dem Beginn der

Krebstherapie mit Zytostatika, bekannt ist, wurde bis
heute kein Weg gefunden, die Resistenzbildung zu verhindern. Charakteristisch für alle bisher untersuchten hochresistenten Tumoren und Zellinien ist die
Amplifikation (Vervielfachung) einer kleinen Gruppe
von Genen. Als Folge dieser DNA- oder Genamplifikation kann eine erhöhte Expression dieser Gene nach-

10

15

30.

gewiesen werden, welche zur Resistenz gegenüber dem Arzneimittel führt. Als Folge dieser DNA-Amplifikation kann eine erhöhte Expression verschiedener Gene nachgewiesen werden. Schutzproteine, die zur Ausschleusung von Giftstoffen aus der Zelle dienen, können so vermehrt gebildet werden (P-Glycoprotein). Dieser Effekt wird auch als "multi-drug-resistance" (MDR) bezeichnet.

Zusätzlich zur MDR korreliert der Amplifikationsgrad gewisser Gene, vor allem gewisser Onkogene, mit dem Grad der Malignität. So sind die Überlebenschancen bei einer Amplifikation von ERVV2, RASKI, INT3, HST1, MYC und KSRAM beim Magenkrebs (Hirohasi, S., and Sugimura, T. Genetic alterations in human gastric cancer. Cancer cells (Cold Spring Habor), 3:49-52, 1991) und ERBB2 und MYC beim Ovarkarzinom (Sasano, H., Garrett, C.T., Wilkinson, D.S., Silverberg, S., Comerford, J., and Hyde, J. Protooncogene amplification and tumor ploidy in human ovarian neoplasm. Hum.Pathol., 21:382-391,1990) sehr schlecht. Beim Brustkrebs korreliert die Amplifikation von MYC (Borg, A., Baldetorp, B., Fernö, M., Olsson, H., and Sigurdsson, H. C-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. Int. J. Cancer, 51:687-691,1992) und Co-Amplifikation von INT2 und HST1 (Borg, A., Sigurdsson, H., Clark, G..M., et al., Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. Br.J.Cancer, 63:136-142, 1991) mit dem Krankheitsverlauf. Die Amplifikation von ERBB2 (Descotes, F., Pavy, J.-J., and Adessi, G.L. Human breast cancer: Correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. Anticancer Res.

13:119-124,1993) und EGFR (Klijn, J.G.M., Berns, p.M.J.J., Schmitz, P.I.M., and Foekens, J.A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. Endocr.Rev., 13:3-17,1992) ist mit einem schlechten Krankheitsverlauf verbunden. Beim Ösophaguskarzinom korreliert die Co-Amplifikation von HST1 und INT2 mit dem Grad der Metastasierung (Tsuda, T., Tahara, E., Kajiyama, G., Sakamoto, H., Terada, M., and Sugimura, T. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. Cancer Res. 49:5505-5508,1989).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch chronische Behandlung mit kanzerogenen Zytostatika induzierte Genamplifikation nicht nur zur Resistenz gegenüber dieser Behandlung führt, sondern auch zur Überexpression gewisser Onkogene, welche den Grad der Malignität kontrollieren.

20 .

15

WO 96/23506

Es sind eine Reihe von Substanzen beschrieben worden, die der erworbenen Arzneimittelresistenz entgegenwirken. Hierzu gehören die von Kennedy (Kennedy, A.R., Prevention of Carcinogenesis by Protease Inhibitors, Cancer Res., 54:1999-2005,1994) beschriebenen Arbeiten über die anti-kanzerogenen Wirkungen von Protease-Inhibitoren. Diese können kanzerogeninduzierte Genamplifikation auf nahezu normale Level herunterdrücken. Kennedy beobachtete, daß strahleninduzierte Genamplifikation in gleicher Weise unterdrückt wird, wie es ihrer Fähigkeit entspricht, strahleninduzierte Transformation zu unterdrücken, so daß auf einen Zusammenhang zwischen beiden Prozessen geschlossen wird. Darüber hinaus wirken Protease-Inhibitoren als Antagonisten von (co-rekombinogenen) Tumor-Promotoren

20

25

30

35'

bei Auslösung von Transformation in vitro. Protease-Inhibitoren werden auch als wirkungsvolle Anti-Promotoren in In-vivo-Untersuchungen beschrieben (Troll, W., Klassen, A., and Janoff, A. Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. Science (Washington DC) 169:1211-1213, 1970).

Aus der Literaturstelle Moscow, I.A., and Cowan, K.H. Multidrug resistance. J.Natl.Cancer Inst. 80: 14-20, 1988, ist bekannt, daß Verapamil der MDR entgegenwirkt. Dieser "calcium channel blocker" erhöht die Zytotoxizität durch Erhöhung der intrazellulären Akkumulation von Arzneimitteln. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Wirkung auf das P-Glykoprotein oder andere Transportproteine. Die Toxizität dieser und ähnlicher Substanzen, wie z.B. Quinidin, steht ihrem klinischen Einsatz im Wege.

Ausgehend hiervon, ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine wirksame Substanz zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Resistenzbildung gegenüber der Zytostatikabehandlung anzugeben und ein entsprechendes Arzneimittel vorzuschlagen.

Die Aufgabe in bezug auf die Substanz wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 1 gelöst, in bezug auf das Arzneimittel durch die Merkmale des Anspruches 9.

Erfindungsgemäß wird somit vorgeschlagen, die Resistenzbildung durch gleichzeitige Gabe von 5' substituierten Nukleosiden und einem Zytostatikum zu verhindern bzw. zu reduzieren. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß 5' Nukleoside die Entstehung

35

von kanzerogeninduzierten Genamplifikationen verhindert oder zumindest abschwächt. Dadurch wird die Möglichkeit eröffnet, durch gleichzeitige Gabe dieser Nukleoside mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistenzen gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und auch den Grad der Malignität zu beeinflus-

Als Beispiel für 5'Nukleoside sind zu nennen: 5-(2-bromovinyl-2'-deoxyuridin (BVDU), (E)-5-(2-bromovinyl)-1-B-D-arabinofuranosyluracil, (E)-5-(2-bromovinyl-2'-deoxy-4'-thiouridin. Abb. 2: 5-Jodo-2'-dexycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin, 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin, besonders bevorzugt ist BVDU und (E)-5-(2-Bromovinyl-)uracyl (BVU).

Die Erfindung betrifft weiterhin Arzneimittel zur Verhinderung der Resistenzenbildung gegenüber Zytostatikabehandlung, die 5' Nukleoside enthalten. Die 5' Nukleoside sind dabei in der Formulierung des Arzneimittels in einer Menge enthalten, aus der eine Konzentration von $0.02~\mu \text{g/ml}$ bis $10~\mu \text{g/ml}$ im Blut resultiert. In Versuchen konnte gezeigt werden, daß der optimale Bereich bei $0.05~\mu \text{g/ml}$ bis $5~\mu \text{g/ml}$ liegt.

Die Zytostatika können dabei in den üblichen bisher bekannten Mengen in der Formulierung enthalten sein (Oshiro, Y., Piper, C.E., Balwierz, P.S., and Garriot, M.L. (1992) Genotoxic properties of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). Fundamental and Applied Toxicology, 18, 491-498). Beispiele für Zytostatika sind Cyclophosphamid und andere Alkylantien, Antimetabolite wie Methotrexat, Alkaloide wie Vinblastin, Antibiotika wie Bleomycin, Cisplatin so-

wie andere Stoffe. Weitere Beispiele für Zytostatika sind aus "Rote Liste 1995", Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, Aulendorf/Württ., 1995, zu entnehmen.

5

Die Träger-, Zusatz- und Hilfsstoffe entsprechen denen, wie sie bisher aus dem Stand der Technik bekannt sind. Das Arzneimittel selbst kann dabei in fester oder flüssiger Form oder auch als Spray vorliegen.

10

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Modellversuchen näher erläutert.

A. Modellsubstanzen

15

20

25

Für die Untersuchung von Amplifikationsphänomenen dient eine Hamsterzellinie, die ein Virus (Simian Virus 40) im Genom integriert enthält. Bekannt ist für diese Zellinie, daß eine Zugabe genotoxischer Substanzen, aber auch verschiedener "nichtgenotoxischer" Kanzerogene und Tumor-Promotoren zur Amplifikation von SV40-DNA im Hamstergenom führt. Die Methode beruht darauf, daß als Sonde dienende markierte SV40-DNA mit Hamsterzell-DNA, die SV40-DNA in amplifizierter Kopienzahl enthält, hybridisiert wird. Die Menge gebundener Sonde gibt Aufschluß über den Amplifikationsgrad der integrierten Virus-DNA.

30

Zur Bestimmung des Amplifikationsgrades wird gleichzeitig mit der SV40-DNA die Albumin-Gen-DNA gemessen. Das Albumin-Gen wird nämlich im Gegensatz zur SV40-DNA in der Zelle nicht amplifiziert. Der Wert des relativen SV40-DNA-Gehalts ergibt sich demnach aus dem Quotienten des Signals der mit SV40-DNA hybridisierten DNA-Sonde zu dem Signal der mit Albumin-Gen hybridisierten DNA-Sonde aus denselben SV40-transformierten embryonalen CO631-Hamsterzellen.

Als Modellsubstanzen dienten:

- Mutagene und rekombinogene genotoxische Kanzerogene (Positiv-Kontrolle)
 Triethylenmelamin (TEM)
 4-Nitrochinolin 1-Oxid (4-NQO)
- 2. Nicht-Kanzerogene (Negativ-Kontrolle), welche weder Mutationen noch Rekombinationen induzieren Aceton

 Dimethylformamid
- 3. Co-rekombinogene Tumor-Promotoren

 Mezerein

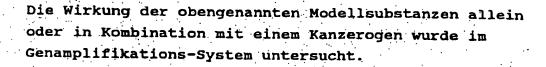
 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)

 Chrysarobin

 Coumarin
- 4. Rekombinogene nicht-genotoxische Kanzerogene mit
 5 unbekanntem Wirkmechanismus
 Thioacetamid
 Acetamid
- 5. Testosteron nach Metabolisierung durch Rattenle30 bermikrosomen (S9-Mix) sowie ohne S9-Mix

 Testosteron wirkt

 mit S9-Mix anti-rekombinogen und
 ohne S9-Mix co-rekombinogen



5 Die Ergebnisse mit den Modellsubstanzen sind in den Figuren 1 bis 3 zusammengefaßt.

Die Nicht-Kanzerogene Aceton und Dimethylformamid zeigen keine Wirkung.

10

15

25

30

Alle anderen Substanzen, die nicht-genotoxischen Kanzerogene mit unbekanntem Wirkmechanismus, Thioacetamid und Acetamid, die genotoxischen Kanzerogene TEM und 4-NQO sowie die Tumor-Promotoren Mezerein, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA), Chrysarobin und Coumarin, für sich allein gegeben, erhöhen die SV4O-Genamplifikation.

Teststeron erniedrigt mit S9-Mix die amplifizierende 20 Wirkung von Methotrexate (MTX), ohne S9-Mix erhöht es die amplifizierende Wirkung von Amino-6-mercaptopurin (AMP).

Diese Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung zwischen der Auslösung von Rekombination und SV40-Genamplifikation.

B. Hemmung kanzerogeninduzierter Genamplifikation durch (E)-5-(2-Bromovinyl-)-2'-deoxyuridine (BVDU)

Die Ergebnisse sind in den Figuren 4 bis 7 zusammengefaßt.



BVDU hatte im Versuch mit Hefen (Figur 4) eine antirekombinogene und co-mutagene Wirkung gezeigt. Diese
Wirkung war in Gegenwart von Lebermikrosomen (S9-Mix)
in niedrigeren Konzentrationen sichtbarer als in Abwesenheit von S9-Mix und auch sehr viel ausgeprägter.
Eine Metabolisierung von BVDU verstärkt also den
antirekombinogenen Effekt.

- BDVU zeigt in klinisch relevanten Dosen eine Hemmung AMP-induzierter Genamplifikation. Der Effekt setzt bei etwa 0,05 μ g/ml ein und führt dosisabhängig bei 5 μ g/ml zu einer vollständigen Hemmung der AMP-induzierten Genamplifikation (Figur 5).
- Der unabhängige Wiederholungsversuch bestätigt das Ergebnis (Figur 6). Darüber hinaus scheint BVDU allein den spontanen Amplifikationsgrad leicht zu erniedrigen.
- Zugabe von 59-Mix zeigt ebenfalls eine Erniedrigung
 AMP-induzierter Genamplifikation. Dieser erfolgt allerdings in einem niedrigeren Dosisbereich als in den
 Versuchen ohne S9-Mix. Eine mögliche Metabolisierung
 von BVDU scheint den amplifikationshemmenden Effekt
 also noch zu verstärken (Figur 7). Dies würde die
 Relevanz der Ergebnisse noch verstärken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß BVDU kanzerogeninduzierte Genamplifikation hemmt. Dies eröffnet
die Möglichkeit, durch gleichzeitige Gabe von BVDU
mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistenzen
gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und die
Malignität zu erniedrigen.

C. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in menschlichen und tierischen
Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung
durch gleichzeitige Gabe von BVDU

5

Die menschliche Tumorzellinie K562-WT (Fig. 8) und die Tumorzellinie F46-WT der Maus (Fig. 9) (WT = Wildtyp = empfindlich gegenüber Zytostatikabehandlung = keine Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere Wochen mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung. Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml Adriamycin bei einer Behandlungszeit von 4 Tagen stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbehandlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich geworden (Figuren 8 und 9). Die Resistenzbildung beruht auf der Amplifikation des MDR-Gens. Nachgewiesen wird dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Verfahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens als Sonde (Figur 10). Resistente Zellen zeigen eine Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am Beginn der Behandlung) zeigen keine Bande.

30

20

In Parallelversuchen wird Adriamycin mit entweder 0,5 oder 1 μ g/ml BVDU zusammen gegeben (BDVU wirkt in menschlichen Tumorzellen erst ab etwa 10 μ g/ml to-xisch, in Zellen der Maus ab etwa 8 μ g/ml (Figuren 8 und 9). BVDU verhindert die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung des BVDU ist so stark, daß die Behandlung

35

20

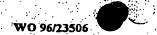
durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden muß, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckt.

BVDU + Adiamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adriamycin-Behandlung allein (Figur 10). Der Effekt der BVDU-Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer, als die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adriamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind bereits vorher abgestorben. Der eigentlich relevante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faßbare Effekt besteht deshalb im Absterben der nichtresistenten Zellen, welche in den Inaktivierungskurven (Figuren 8 und 9) gemessen wird.

Da die Resistenzbildung gegenüber Zytostatikabehandlung in menschlichen Tumoren ebenfalls auf der Amplifikation des MDR-Gens beruht, ist durch die Kombination von BVDU mit einem beliebigen Zytostatikum die
Möglichkeit geboten, die Therapie in niedrigen Dosen
und über längere Zeiträume als bisher durchzuführen.
Im übrigen ist die Verhinderung der Resistenzbildung
auch für andere Anwendungen von großer Bedeutung.

D. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung durch gleichzeitige Gabe von anti-rekombinogenen 5'substituierten Nukleosiden

In den Figuren 11 und 12 ist zu sehen, daß die antirekombinogene Wirkung nicht nur spezifisch für BVDU



gilt, sondern eine Eigenschaft aller 5'-substituierten Nukleoside ist.

Fig. 11 zeigt dabei die anti-rekombinogenen Effekte von (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin, (E)-5-(2-bromovinyl)-1-8-D-arabinofuranosyl-uracil und (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin in Saccharomy-ces cerevisiae MP1, und

Fig. 12 die anti-rekombinogenen Effekte von 5-Jodo-2'-deoxycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin und 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin in Saccharomyces cerevisiae MP1.

15 Die Tumorzellinie F4-6-WT der Maus (WT = Wildtyp = empfindlich gegenüber 2ytostatikabehandlung = keine Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere Wochen mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung. 20 Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml Adriamycin bei einer Behandlungszeit von 4 Tagen stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbehandlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen 25 gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich geworden (Figur 13 und 14). Die Resistenzbildungberuht auf der Amplifikation des MDR-Gens. Nachgewiesen wurde dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Verfahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens als Sonde (Figur 15). Resistente Zellen zeigen eine Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am Beginn der Behandlung) zeigen keine Bande. Die Level von B-Actin mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert.



B-Actin wurde als interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.

In Parallelversuchen wurde Adriamycin mit 1 μ g/ml je eines 5'substituierten Nukleosids zusammen gegeben. Alle sechs 5'-substituierten Nukleoside verhindern die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung der 5'substituierten Nukleoside war so stark, daß die Behandlung durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden mußte, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckte.

- Figur 15 zeigt die Northern Blot Analyse der RNA: Expression der MDR-Gene in der Tumorzellinie F4-6-WT der Maus. Die Level von B-Actin mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert. B-Actin wurde als interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.
- pos. Adriamycin-resistente F4-6-WT Zellen 20 neg. Adriamycin-empfindliche F4-6-WT Zellen
 - 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin + 1 Adriamycin
 - 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl-1-B-D-arabinofuranosyl-uracil + Adriamycin
 - 1 μ g/ml (e)-5-(2-bromovinyl-2'-deoxy-4'-thiouridin + Adriamycin
 - 1 μ g/ml 5-Jodo-2'-deoxycytidin + Adriamycin
 - 1 μg/ml 5-Jodo-2'-deoxyuridin + Adriamycin
- 1 mg/ml 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin + 6 30 Adriamycin
 - 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl-)-2'-deoxyuridine (BVDU) + Adriamycin

10

5'-substituiertes Nukleosid + Adriamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adriamycin-Behandlung allein (Figur 15). Der Effekt der Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer als es die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adriamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind ja bereits vorher abgestorben. Der eigentlich relevante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faßbare Effekt besteht deshalb im Absterben der nichtresistenten Zellen, welcher in den Inaktivierungskurven (Figur 13 und 14) gemessen wurde.



Patentansprüche

- Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in Kombination mit mindestens einem Zytostatikum zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Resistenzenbildung bei der Zytostatikabehandlung.
- Verwendung nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid
 (E)-5-(2-Bromovinyl-)-2'-deoxyuridin (BVDU)
 und/oder seine Metaboliten verwendet werden.
 - 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Metabolit (E)-5-(2-Bromovinyl-)-uracyl (BVU) verwendet wird.
- 20 4. Verwendung nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5(2-bromovinyl)-1-B-D-arabinofuranosyluracil
 und/oder seine Metaboliten verwendet werden.
- 25 5. Verwendung nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin und/oder
 seine Metaboliten verwendet werden.
- 30 6. Verwendung nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jodo-2'-deoxycytidin und/oder seine Metaboliten
 verwendet werden.

WO 96/23506

10

15

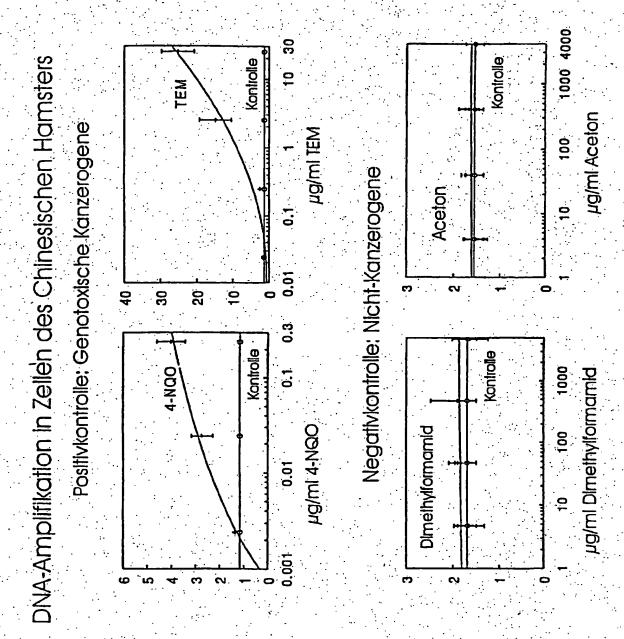
20



- 7. Verwendung nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jodo-2'-deoxyuridin und/oder seine Metaboliten
 verwendet werden.
- 8. Verwendung nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 2'Deoxy-5-trifluoromethyluridin und/oder seine
 Metaboliten verwendet werden.
- 9. Arzneimittel, enthaltend 5'-substituierte Nukleoside, nach mindestens einem der Ansprüche 1
 bis 8, in einer Menge, aus der eine Konzentration von 0,02 μg/ml bis 10 μg/ml im Blut resultiert, mindestens ein Zytostatikum und übliche
 Träger- und Hilfsstoffe.
- 10. Arzneimittel nach Anspruch 9,
 dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleoside in
 einer Menge enthalten sind, aus der eine Konzentration von 0,05 μg/ml bis 5 μg/ml im Blut resultiert.
- 11. Arzneimittel nach Anspruch 9 oder 10,
 25 dadurch gekennzeichnet, daß die Zytostatika ausgewählt sind aus Alkaloiden, Alkylantien, Antimetaboliten, Antibiotika oder Cisplatin.

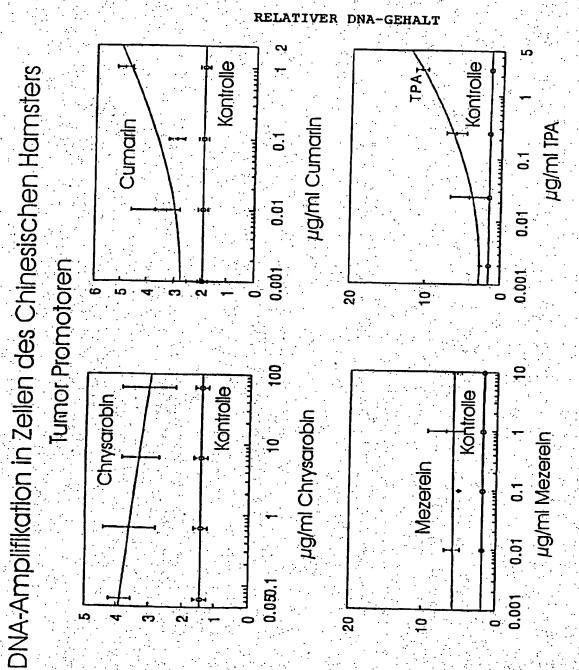
FIG. 1

RELATIVER DNA-GEHALT



2/15

FIG.2



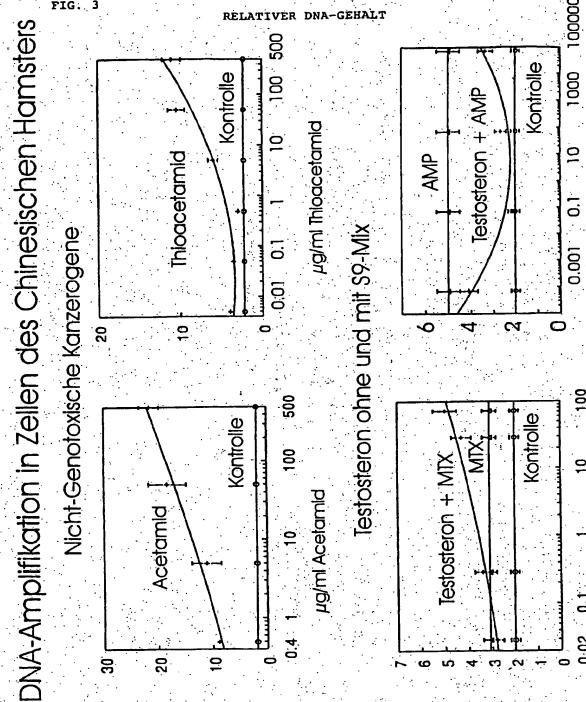
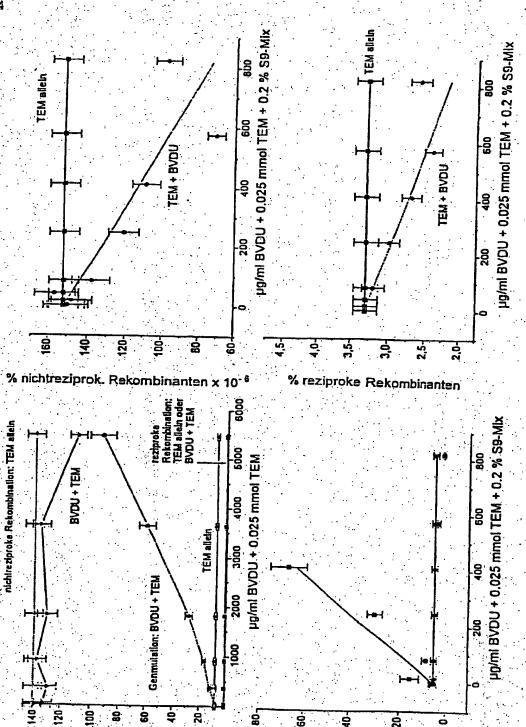


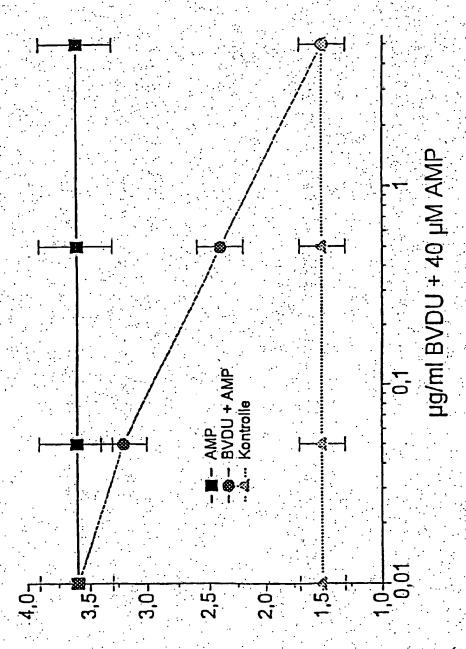
FIG. 4



% nichtreziproke Rekombinanten/Mutanten x 10 5 % reziproke Rekombinanten

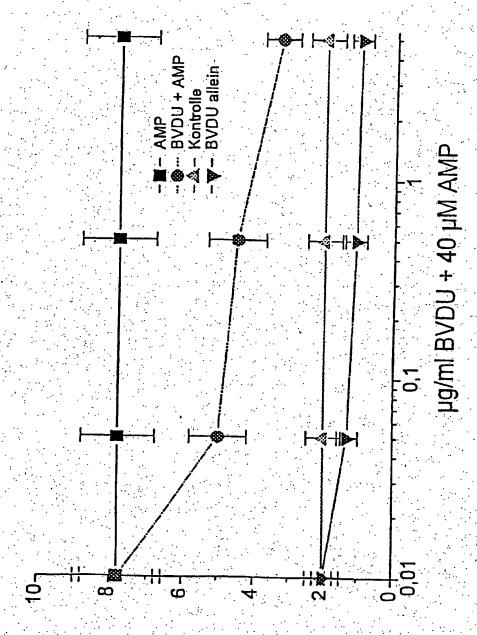
% Mutanten x 10-6

FIG. 5



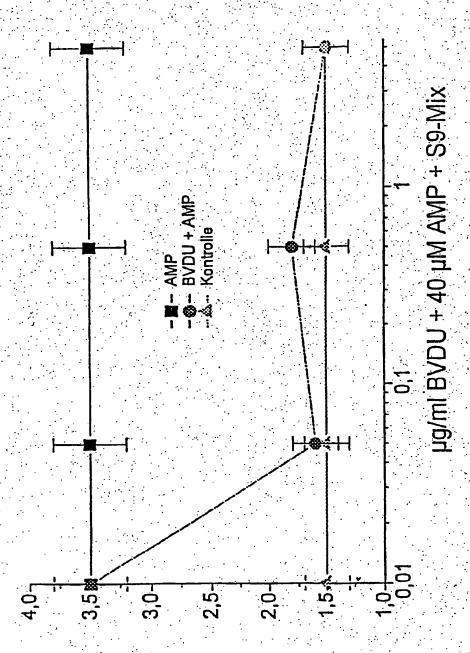
relativer DNA-Gehalt

FIG. 6

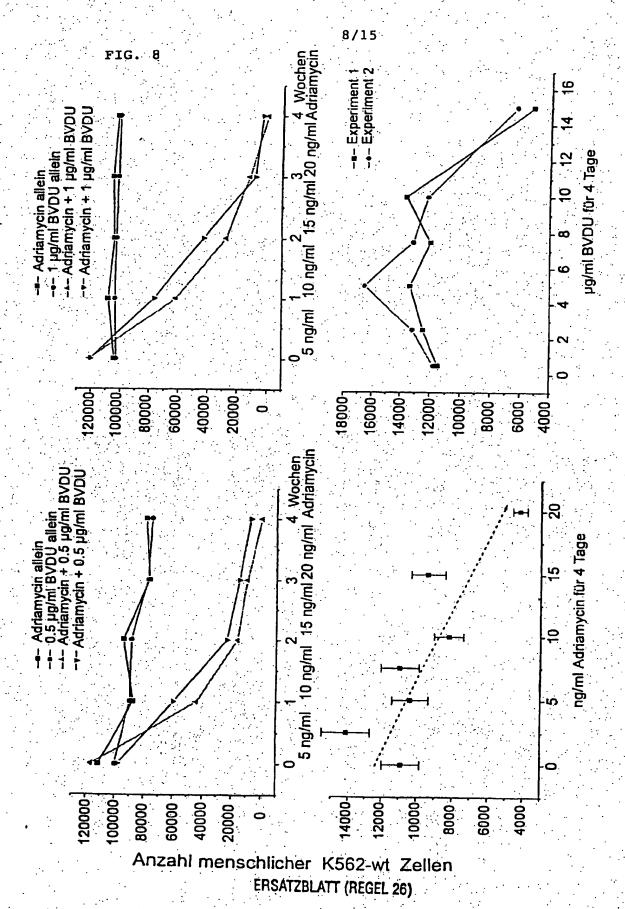


relativer DNA-Gehalt

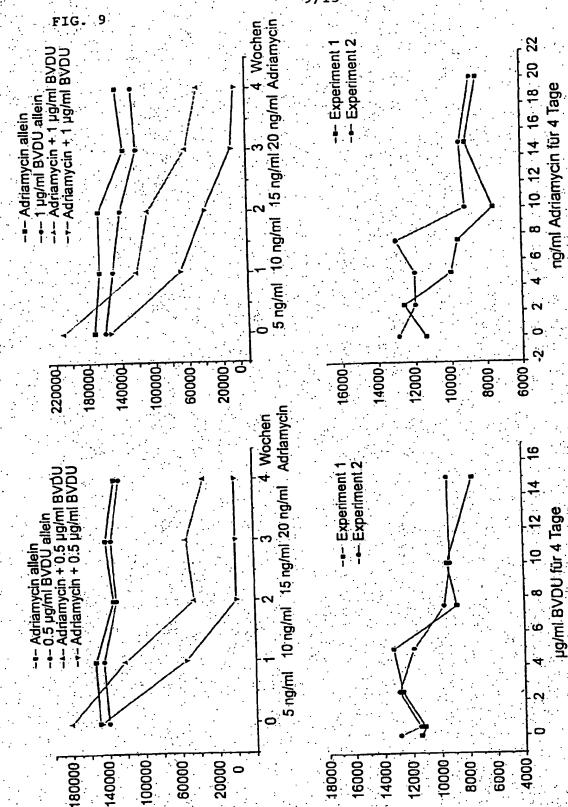
FIG. 7



relativer DNA-Gehalt





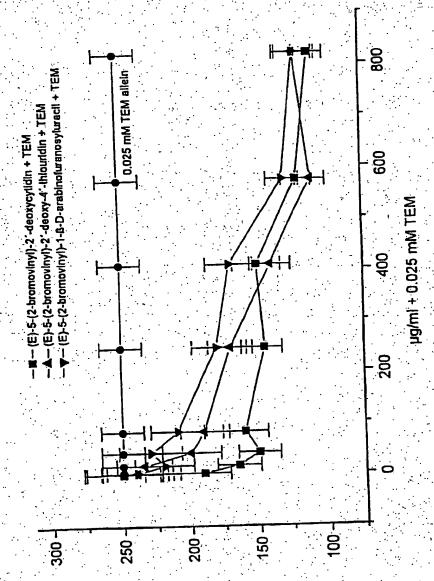


Anzahl von F4-6-wt Mauszellen ERSATZBLATT (REGEL 26)

FIG: 10

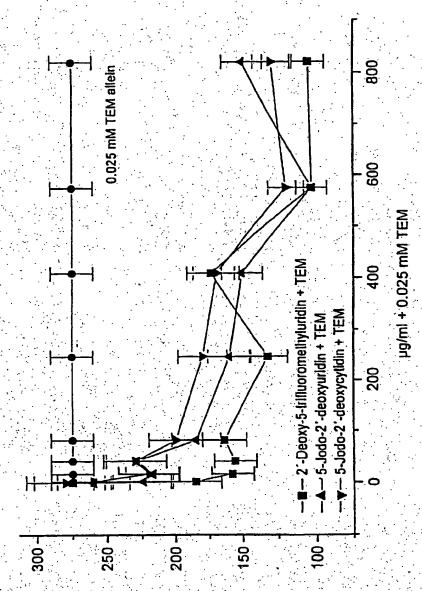
Actin-Gen (Kontrolle) mit Hilfe der Northern-Technik - Als Sonde diente das MDR-Gen Nachwels der Amplifikation des MDR-Gens in F46-WT-Zellen JONE X CHOMOHOW HILL CINDIDIO DE TOURS DE SOLITORES POND X LIDAUDIDA TO TO TO THE The Olinologia strange of the Olinologia str CHOMOHOUS THEY Olylololo Polity UP HOUSELD HOUSE OLANOLOLIA SALANDA SOO OOLIS OUNDLOVE TEO LUNGO

FIG. 11



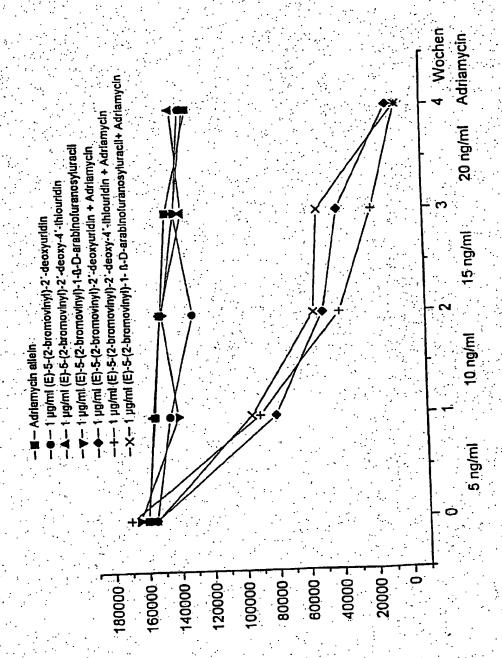
% nichtreziproke Rekombinanten x 10⁻⁶

FIG. 12



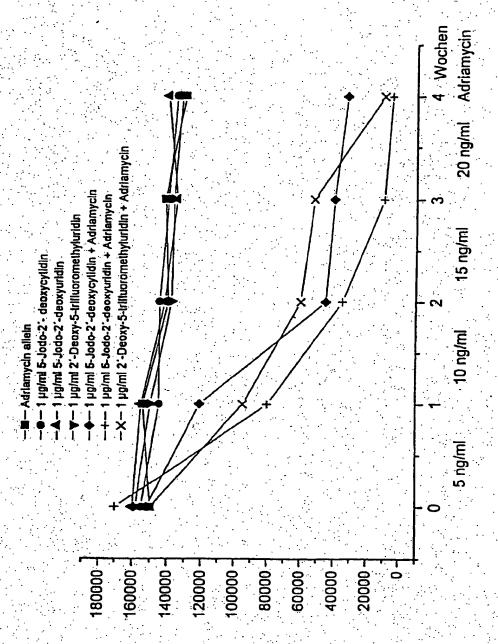
% nichtreziproke Rekombinanten x 10 -6

FIG. 13



Anzahl F4-6-wt Tumorzellen

FIG. 14

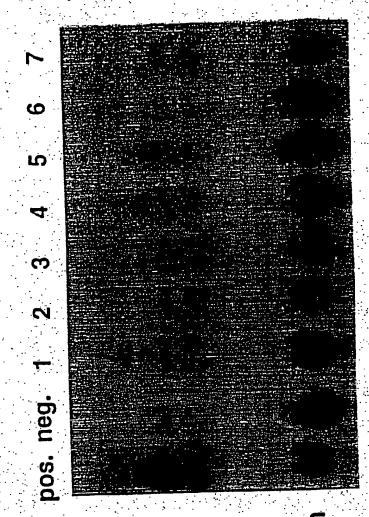


Anzahl F4-6-wt Tumorzellen

WO 96/23506 PCT/DE96/00169

15/15

FIG. 15



mdr

3-Aktir



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Mimmum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base committed during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY.	1,7,11
	vol. 22, no. 6, 1984,	
	pages 333-334, XP000574699	
	CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID	
	LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT WITH IODO-DEOXYURIDINE"	
	see page 334	
. :		
X	TODAY'S LIFE SCIENCE,	1,2,11
	vol. 2, no. 9, 1990, pages 32-38 80, XP000575102	
	S. LOCARNINI: "HEPATITIS B ANTIVIRAL	
	THERAPY"	
A	see page 37, left-hand column - page 38,	3-5,7,8
	middle column; table 1	
- 1		
: i		

* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such document, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 5 July 1996	Date of mailing of the international search report 15.07.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. \$\$18 Patentiaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tz. 31 651 epo nl, Part (+31-70) 340-3016	Authorized officer Kanbier, D

Form PCT/ISA/218 (second sheet) (July 1992)

Special categories of cited documents:

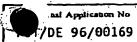


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DE96/00169

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This intern	national search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	because they relate to subject marter not judance to be
2. X	Claims Nos.: 1-11 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such
	an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: In view of the large number of compounds which are defined by the wording
•	of the claims, the search has been performed on the general loca and
	compounds mentioned in the examples of the description.
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
	
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)
This Inte	mational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
	[프로스토니트 : [18] [18] [18] [18] [18] [18] [18] [18]
	사람들이 되었으면 하다는 사람이 살아가 된 사이지는 바람들은 아이들의 나도 되었다.
: .	
 	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all
"	searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
	of any additional fee.
]3. 🔲	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
<u> </u>	
	[기본 시간회 기업에 하는 사회에 가는 경우를 하실할 하실을 됐다.
	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
_	lestricted to the misention that inclinioned in the state of
	k on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
Remark	k on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.
Form PC	T/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT



<u> </u>		7DE 96	אַסןמטאַ	
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.	
	50 4 0 400 710 (TAMEDA CUENTON) THOUSE THE			
X	EP,A,O 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3 June 1992	,	1,11	
	see page 4; claims 1,6,8,13,15; example 6			
• •		٠. ٠		
X	BE,A,640 236 (SODERSI) 16 March 1964	•	1,11	
	see page 4; claims 1-3,6,7			
	see page 10			
Χ.	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL		1,2,11	
. ,	ONCOLOGY,			
•	vol. 20, no. 4, 1984,			
	pages 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL			
, , l	(E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE			
	TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
	CANCER PATIENTS"			
٠	see page 472, right-hand column; table 2		9,10	
,	CANCER RESEARCH,		1,7,11	
	vol. 54, no. 10, 1994,			
	pages 2701-2706, XP000574738			
	CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE			
÷. ;	CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN			
	BLADDER CANCER CELLS			
::. ·	see page 2705, right-hand column			
. • .·.	see page 2701-2			
	J. CELL. PHARMACOL.,		1,7,11	
	vol. 1, no. 1, 1990,		****	
	pages 2-7, XP000575045			
	WROBLEWSKI, HACKER: THE POSSIBLE ROEL OF			
	ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE			
	see page 6, left-hand column			
1.5	GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11		1,11	
12	May 1977 see page 1, right-hand column - page 2,			
	left-hand column; claim 1			
1				
·				
 .			the way to the first	

Form PCT/ISA/210 (continuation of money shout) (July 1992



PCT/DE 96/00169

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- 132756 DE-D- 69116321 DE-T- 69116321 JP-A- 5078256 US-A- 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- 1567001 FR-M- 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	NONE	

Form PCT/ISA/216 (petent family annex) (July 1992

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, Bd. 22, Nr. 6, 1984, Seiten 333-334, XP000574699 CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT	1,7,11
X	WITH IODO-DEOXYURIDINE* siehe Seite 334 TODAY'S LIFE SCIENCE, Bd. 2, Nr. 9, 1990.	1,2,11
Α	Seiten 32-38 80, XP000575102 S. LOCARNINI: "HEPATITIS B ANTIVIRAL THERAPY" siehe Seite 37, linke Spalte - Seite 38, mittlere Spalte; Tabelle 1	3-5,7,8

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
*Besonders Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzuschen ist E' älteres Dohument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Asmeldedatum veröffentlicht worden ist 'L' Veröffentlichung, die gozignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung beist werder soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmehdedatum, aber nach dem beauspruchten Prioritätisdaum veröffentlicht worden ist	erfinderischer Tätigkeit berühend betrachtet werden "Y" Veröffendichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindun kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit berühend betrachtet werden, wenn die Veröffendichung mit einer oder mehreren anderen Veröffendichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Erschaus nach einer der	
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedénum des internationalen Recherchenberichts	
5.Juli 1996	15.07.96	
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Bevollmächtigter Bediensteter	

ian PCT/ISA/218 (Bian 2) (Juli 1992)



ionales Aktenteichen PCT/DE 96/00169

.Kategorie* E	ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	nenden Leie	
	ezenchnung der Veröffendlichung, noweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kome		Betr. Ampruch Nr.
1			
	EP.A.O 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES		1,11
X	LTD) 3. Juni 1992		
	siehe Seite 4; Ansprüche 1,6,8,13,15;		
	Beispiel 6		
	Reizhiei o		
	BE,A,640 236 (SODERSI) 16.Marz 1964		1,11
X	siehe Seite 4; Ansprüche 1-3,6,7		
	siehe Seite 10		
	Sieue Seire in		
	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL		1,2,11
X	FORDAMIN DOMINIT OF CHILDRIN		
1 1	ONCOLOGY, Bd. 20, Nr. 4, 1984,		
	Seiten 471-476, XP000575098		
	WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL		
	(E) -5- (2-BROMOVINYL) -2'-DEOXYURIDINE		
	TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN		
· [· · · · ·].	CAUCED DATIENTS		
	siehe Seite 472, rechte Spalte; Tabelle 2		9,10
A	STORE Delice Avel Leading about 19 years of the		
	CANCER RESEARCH,		1,7,11
X	Bd. 54, Nr. 10, 1994,		
	Seiten 2701-2706 XP000574/38		
	CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE		
	CHEMOSENSITIZATION OF		
	CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN		
	BLADDER CANCER CELLS"		
	siehe Seite 2705, rechte Spalte		
	siehe Seite 2701-2		
A .	J. CELL. PHARMACOL.,		1,7,11
1	Bd. 1. Nr. 1. 1990,		
- []	Seiten 2-7. XP000575045		
	MOUSIFMSKI HACKER: "THE PUSSIBLE KUEL OF		
	ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN		
	RESISTANCE"		
.	siehe Seite 6, linke Spalte		
	and the control of th		1.11
Α	GB.A.1 473 148 (RESEARCH CORPORATION)		
	11 Mag 10//		
	siehe Seite 1, rechte Spalte - Seite 2.		
	linke Spalte; Anspruch 1		
			
	The second of th		

Feld I	Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1
Gemil	Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. L	Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
•	
• .	
2. X	Ansprüche Nr. 1-11 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
	weit sie sich auf Teile der internationalen Anmeidung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
	In view of the large number of compounds which are defined by the wording
	of the claims, the search has been performed on the general idea and compounds mentioned in the examples of the description.
	compounds mentioned in the examples of the description.
`, L	Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II	Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Die inte	rnationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
•	
. \Box	
٠ ٢	Da der Ammelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
•	보통하는 경에 가장하는 가장 하나면 그는 경험 보통 보았다는 물을 바람들이 가장 가장 하다.
2	Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine
- <u> </u>	zusätzliche Recherchengebilhr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
•••••	Ceough surgerorer.
	교육 보기한 경기를 가장 되었다. 그는 내가 된 것도 되었다. 학생 가장 하는 사람들이 있다.
3. L	Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden
	sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
•	그리는 말을 되었으면 되면 되는 것이 하는데 말이 하는데 그 때문에 없는데 되었다.
•	
	진 불어야 하고 안전하다 당신하는 번에 쓰는 그림이번째, 이번만 반장 어떻게 살았다며, 회
<u>⁴</u>	Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recher- chenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung diese ist in folgenden Ansprüchen er-
••••	
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	
. :	하고 있었다고 하이 작가 무슨 때로 나갔다고 있다면 하다 하다 하고 있는데 그 이 없었다.
Benerio	mgen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
	Die Zahlung zustrzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.
•••	
•	

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortertzung von Blatt 1 (1))(Juli 1992)



RECHERCHENBERICHT

ich e zur selben Patentfamilie gehörer

PCT/DE 96/00169

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffendichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- 132756 DE-D- 69116321 DE-T- 69116321 JP-A- 5078256 US-A- 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- 1567001 FR-M- 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	KÈINE	

Formblatt PCT/ISA/218 (Ashang Patentfamilie)(Juli 1992